



Universidad de Carabobo  
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología  
Departamento de Biología  
Trabajo Especial de Grado



# **Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilofagos aislados de madera en descomposición**

Presentado por: Br. Maury Prado

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Tutor académico:** Domenico Pavone Maniscalco

Valencia, Marzo 2016

*A mi Dios Todopoderoso*

*A mi madre*

*A mi hermano Alexis*

*A mi futuro esposo Carlos*

## ***Agradecimientos***

### ***A Dios***

*Por iluminarme mi vida y darme la fortaleza y todo lo necesario para seguir en este camino de formación. Además por su infinito amor y bondad.*

### ***A mis padres Migdalia Tovar y Alfredo Prado***

*Por haberme dado su apoyo incondicional en todo momento hasta ser una profesional, a ellos les debo mi educación y más. Los amo inmensamente.*

### ***A mi novio hermoso y futuro esposo Carlos Arvelo***

*Por amarme y apoyarme incondicionalmente con mucha paciencia para que pueda hacer posible todas las metas que me proponga en mi vida. Te amo cielo.*

### ***A mis familiares***

*A mi hermano Alexis Tovar, por su apoyo, junto a él aprendí aciertos y momentos difíciles. Te quiero hermano.*

### ***A mis bellas amigas y colegas***

*Dorelis Montero y María Silva por su paciencia y apoyo a lo largo de mi carrera. Las quiero chicas.*

### ***A todo el personal que labora en la Escuela de Biología Facyt***

*En especial a mi tutor, el profesor Domenico Pavone, por su aporte de conocimientos y paciencia para conmigo.*

*Agradezco sinceramente a todas esas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible la realización de esta tesis.*

*“El agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien”.*  
*Quevedo*



Universidad de Carabobo  
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología  
Departamento de Biología  
Trabajo Especial de Grado



## **Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilófagos aislados de madera en descomposición**

**Tutor académico:**  
Domenico Pavone

**Autor:**  
Br. Maury Prado

### **RESUMEN**

La finalidad de este Trabajo Especial de Grado es optimizar la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilófagos de madera en descomposición. El primer paso en la experimentación de este trabajo, se basó en la obtención de aislados fúngicos a partir de madera en descomposición, con la finalidad de realizar pruebas preliminares para conocer cuál de éstos poseía la mayor capacidad celulolítica. Se lograron obtener 6 aislados fúngicos con capacidad celulolítica, de los cuales, el aislado 1 fue capaz de degradar la celulosa del lodo paplero en mayor medida  $0,0148 \pm 0,01140$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ , el cual fue utilizado en los subsiguientes ensayos, donde se evaluó el efecto de las variaciones de las condiciones de cultivo del hongo. Se obtuvo que las mejores condiciones para la obtención de las mayores actividades celulasas son: sustrato disgregado; concentración de lodo paplero al 3% p/v; sales minerales Nutrisol P® y Nutrisol K® al 3 % p/v de cada una; medio sin modificación de pH (pH 3); tiempo óptimo de incubación fermentativa en agitación entre 168 y 264 horas; incubación postfermentativa (40°C, sin agitación) entre 96 y 120 h; temperatura de incubación postfermentativa (sin agitación) a 40°C. Obteniendo un rendimiento de actividad celulasas de  $0,1355 \pm 0,0027$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ . A partir de los cultivos sumergidos obtenidos de las condiciones óptimas para la obtención de las enzimas celulasas, se realizó una precipitación de enzimas, para concentrar el pool enzimático obtenido, y así obtener un producto semicomercial concentrado, con el volumen requerido para su uso y facilitar su transporte y almacenamiento. Para obtener el precipitado de enzimas se utilizó etanol a diferentes concentraciones, encontrándose que fue más eficiente la precipitación en los tratamientos con 25% y 50% de etanol.

**Palabras claves** Precipitación, lodo paplero, celulolítica, enzimática.



Universidad de Carabobo  
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología  
Departamento de Biología  
Trabajo Especial de Grado



## **Optimization of the production of cellulase enzymes obtained by decaying wood isolated xylophagous fungus**

**Tutor académico:**  
Domenico Pavone

**Autor:**  
Br. Maury Prado

### **ABSTRACT**

The purpose of this Degree Thesis is to optimize the production of cellulase enzymes obtained from decaying wood xylophagous fungus. The first step in the experimentation of this work was based on obtaining fungal isolates from decaying wood, in order to perform preliminary tests to determine which of these had the highest cellulolytic capacity. It was possible to obtain 6 fungal isolates with cellulolytic capacity, of which, isolate 1 was able to degrade further the cellulose of papermaking sludge  $0.0148 \pm 0.01140$   $\mu\text{mol}$  of glucose / mL.h, which was used in the subsequent assays, where the effect of variations in fungus culture conditions was evaluated. It was obtained that the best conditions for obtaining the major cellulase activities are: disintegrated substratum; papermaking sludge concentration at 3% w/v; Nutrisol P® and Nutrisol K® mineral salts at 3% w/v of each one; medium without pH modification (pH 3); optimal time of fermentative incubation in stirring between 168 and 264 hours; post-fermentative incubation (40 ° C, without stirring) between 96 and 120 h; post-fermentative incubation temperature (without stirring) at 40 ° C, obtaining a yield of cellulase activity of  $0.1355 \pm 0.0027$   $\mu\text{mol}$  of glucose / mL.h. As of the submerged cultures obtained from the optimal conditions to obtain cellulase enzymes, a precipitation of enzymes was performed, to concentrate the enzymatic pool obtained, and then obtain a semi-commercial product concentrated, with the volume required for its use and facilitating its transport and storage. In order to obtain the precipitate of enzymes, ethanol was used at different concentrations, and it was found that the precipitation in the treatments with 25% and 50% of ethanol was more efficient.

**Keywords:** Precipitation, papermaking sludge, cellulolytic, enzymatic.

# ÍNDICE GENERAL

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.-OBJETIVOS</b>  |           |
| Objetivo general.....  | 12        |
| Objetivos específicos.....   | 12        |
| <b>3.-MARCO TEÓRICO</b>  |           |
| 3.1. Hongos xilofagos.....   | 13        |
| 3.2. Colonización de los hongos.....   | 14        |
| 3.3. Composición y estructura química de la madera.....                                      | 15        |
| 3.4. Tipos de pudrición de la madera.....  | 17        |
| 3.5. Actividad enzimática de los hongos de pudrición.....                                    | 18        |
| 3.5.1 Lignina y enzimas ligninolíticas.....  | 18        |
| 3.5.2 Hemicelulosa y hemicelulasa.....   | 19        |
| 3.5.3 La celulosa y las celulasas.....   | 19        |
| 3.6. Obtención de enzimas celulasas mediante fermentación sumergida.....                     | 20        |
| 3.7. Factores que afectan la producción de celulasas.....                                    | 20        |
| 3.8. Determinación de la actividad celulolítica.....   | 21        |
| 3.9. Precipitación de enzimas.....   | 22        |
| 3.10. Aplicaciones ecológicas y biotecnológicas de los hongos degradadores de la madera..... | 23        |
| <b>4.-ANTECEDENTES .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>5.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |           |
| 5.1. Área de muestreo.....   | 26        |
| 5.2. Recolección de ejemplares.....  | 26        |

|   |              |
|---|--------------|
| 5.3. Aislamiento y condiciones de cultivo.....  | 26           |
| 5.4. Residuos de la industria papelera .....  | 26           |
| 5.5. Fermentaciones sumergidas del aislado fúngico para obtención de enzimas<br>celulasa      |              |
| 5.5.1. Condiciones de la fermentación... ..   | 27           |
| 5.5.2. Evaluación preliminar de la actividad celulasa .....                                   | 27           |
| 5.5.3. Efecto de la disgregación de la fuente de carbono .....                                | 27           |
| 5.5.4. Efecto de la concentración de la fuente de carbono .....                               | 27           |
| 5.5.5. Efecto de la concentración de las sales minerales .....                                | 27           |
| 5.5.6. Efecto del pH.....   | 28           |
| 5.5.7. Efecto del tiempo de incubación postfermentativa.....                                  | 28           |
| 5.5.8. Efecto de la temperatura de incubación postfermentativa.....                           | 28           |
| 5.5.9. Efecto del tiempo de fermentación.....   | 28           |
| 5.6. Determinación de azúcares reductores (glucosa) como medida de actividad<br>celulasa..... | 28           |
| 5.7. Precipitación de enzimas celulasas.....  | 29           |
| 5.8. Determinación de la actividad celulasa de los precipitados .....                         | 29           |
| 5.9. Análisis estadístico .....   | 30           |
| <b>6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>31-43</b> |
| <b>7.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>   | <b>44</b>    |
| <b>8.-BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>46</b>    |
| <b>9.-APENDICE .....</b>  | <b>54</b>    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Molécula de celulosa mostrando los enlaces $\beta$ -1,4. Fuente: Ovando-Chacón, y Waliszewski (2005).....  | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Lignina compuesta por unidades repetidas de alcoholes p-cumaril, coniferil y sinapil Fuente: Pentilla & Saloheimo(1999).....   | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Degradación de la celulosa. Se muestran los sitios de actividad de las enzimas hidrolíticas de la celulosa. Fuente: Aro <i>etal</i> ,2005 .....  | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Aislados fúngicos obtenidos a partir de las muestras de madera en descomposición, en medio PDA.....  | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Evaluación preliminar de la actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en los morfotipos aislados a los 5 días de fermentación. Los tratamientos con letras distintas poseen diferencias significativas entre sí .....      | 27 |
| <b>Figura 6.</b> Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo paplero al 1% disgregado y sin disgregar a las 72 horas de fermentación...28   |    |
| <b>Figura 7.</b> Actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones (0,5%, 1%, 2% y 3%).....   | 29 |
| <b>Figura 8.</b> Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado (3%) bajo diferentes concentraciones de sales minerales (0,5; 1; 2; 3 % y control 0%) a las 72 horas de fermentación..... | 32 |

**Figura 9.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelero disgregado a las 72 horas de fermentación bajo diferentes valores de pH (4, 5, 6 y control 3) ..... 33

**Figura 10.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelero disgregado a las 72 horas de fermentación bajo diferentes tiempos de incubación postfermentativa (24, 48, 72, 96 y 120 horas)a40°C ..... 34

**Figura 11.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelero disgregado a las 72 horas de fermentación en diferentes temperaturas de incubación postfermentativa: 25, 40, 50y60°C .....36

**Figura 12.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelero disgregado a diferentes tiempo de incubación en agitación: 48, 96, 168, 216 y 264 horas.....38

**Figura 13.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu$ moles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelero disgregado, precipitados con diferentes concentraciones de etanol. Tratamientos: control; 25% de etanol; 50% de etanol y 75% de etanol.....39





## 1.-INTRODUCCIÓN

La degradación de la madera es uno de los procesos involucrados en el ciclo biogeoquímico del carbono y del nitrógeno, siendo, la madera, el sustrato de numerosas especies de organismos, incluyendo a los hongos. La madera está compuesta por celulosa, lignina y hemicelulosa (Gáfaró, 1995); y los hongos, son capaces de convertir el detritus orgánico en capas de humus en el suelo, liberando nutrientes que pueden ser absorbidos por las plantas. Al colonizar los troncos caídos, los hongos pueden utilizar dichos polímeros como fuentes de carbono, conllevando así a la degradación de la madera. Para la degradación de la celulosa, se requieren enzimas celulasas, que son sintetizadas por una gran variedad de bacterias y hongos, siendo los hongos filamentosos uno de los principales responsables de la mayor actividad celulolítica en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas enzimáticos. El sistema celulolítico comprende varias enzimas como las endoglucanasas, las exoglucanasas y las  $\beta$ -galactosidasas (Baldrian,2008)

. La importancia las enzimas celulasas en la degradación de residuos orgánicos sólidos en la industria se debe a que presentan aplicaciones biotecnológicas, tales como:

- En la Industrial textil, contribuye en la remoción de impurezas y modificación de propiedades físicas de las fibras, tratamiento controlado de las fibras de celulosa, creación de suavidad en las fibras, generación de un aspecto descolorido de vestidos y procesos de acabado textil (Ponce,2002).
- Cervecería y vinos: Crean un complejo de óptima maceración en la producción de estos productos, además de mejorar su estabilidad, rendimiento de la hidrólisis y filtrabilidad (Roldan *et al*,2006).
- En la Industria de alimentos se utiliza en los pasos de extracción y clarificación de jugos, néctares y purés de frutas vegetales, mejoramiento de la calidad de cereales, aceite de oliva, etc. (Das *et al*, 1994), (Freitas *et al*,1993).
- En la industria energética, utilizada para la obtención de biocombustible entre ellos el proceso de bioconversión de la celulosa a etanol (Martínez *et al*,2008).

- En lavandería, en la formulación de detergentes, tiene capacidad para modificar la superficie celulósica del hilo de la prenda (Ponce, 2002).

A pesar de la gran importancia que este tipo de enzimas posee a escala industrial, en Venezuela no existe una producción masiva de las mismas, por lo que se convierte en un producto de importación. Por ello, es importante encontrar nuevos microorganismos celulolíticos altamente productores que degraden la celulosa y proponer alternativas de producción de enzimas a escala nacional.

## **2.-OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Estudiar la diversidad de hongos en madera en descomposición y su capacidad de producir enzimas celulasas.

### **Objetivos específicos:**

- Obtener aislados de hongos provenientes de madera en descomposición.
- Evaluar la producción de enzimas celulasas en fermentaciones sumergidas a partir de hongos aislados en madera en descomposición.
- Proponer un producto semicomercial con actividad celulasa.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Hongos xilófagos**

Los hongos son organismos eucariotas multicelulares heterótrofos, no contienen clorofila, por lo que no realizan fotosíntesis, y obtienen su alimento de forma directa e indirecta por absorción de los productos generados por exoenzimas. Existen hongos descomponedores llamados saprobios, los cuales descomponen y absorben los nutrientes de la materia orgánica tales como troncos caídos. Los hongos están adaptados para descomponer la materia orgánica, como la celulosa y la lignina, que son los componentes de las paredes celulares, que sirven de fuente de carbono a los hongos (Campbell & Reece, 2007).

El ciclo de vida de los hongos comienza con las esporas, las cuales son dispersadas por el viento, la lluvia o por los animales. En condiciones de humedad y de temperatura adecuadas, de las esporas emergen las hifas que son las que degradan la madera, ya que se alimentan de las sustancias de reserva del interior de las células y segregan enzimas que descomponen la pared celular permitiendo ser asimiladas por éstas. Posteriormente, las hifas aumentan en número y tamaño formando el micelio que puede desarrollarse interna o externamente en el sustrato. Finalmente, en el caso de los Basidiomycetes, se forma el cuerpo fructífero del hongo, el cual es característico de cada tipo y es el que se observa macroscópicamente. Este cuerpo fructífero tiene la capacidad de formar esporas (Gonzales, 2012).

Los organismos xilófagos pueden alimentarse de la madera, provocando la degradación de la misma y afectando sus propiedades físicas y mecánicas. Entre los organismos xilófagos se encuentran las bacterias, hongos e insectos (Peraza & Bobadilla, 2001). Las bacterias se encuentran en la madera descompuesta debido a que pueden utilizar los componentes no estructurales, como los azúcares solubles, almidón y resinas, e incluso utilizar los componentes estructurales; atacan la celulosa de la madera transformándola por medio de enzimas en celobiosa, hidrógeno, metano, anhídrido carbónico y ácidos grasos. Entre las bacterias presentes en la madera en descomposición, se encuentran principalmente

gram negativas, tales como *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp (Encinas *et al.*, 2002). Entre los insectos xilófagos que se aprovechan de la celulosa se encuentran los insectos de ciclo larvario como las carcomas y los insectos sociales como las termitas (Ascuasiati, 2012).

Los hongos xilófagos son los mohos, los hongos cromógenos y los hongos de pudrición (Saccarello, 2010). **Los mohos** se alimentan de los materiales almacenados en el interior de las células de la madera (lumen). Son incapaces de alimentarse de los principales componentes de la pared celular (celulosa y lignina), por lo que no producen pérdidas significativas en la resistencia de la madera. **Los hongos cromógenos** al igual que los mohos, solo se alimentan del lumen y tampoco producen degradaciones de la pared celular. Se caracterizan porque producen coloraciones como el azulado (Gonzales, 2012). **Los hongos de pudrición** se refieren a un grupo capaz de utilizar la madera como alimento, al digerir con enzimas la lignina y celulosa de las paredes celulares. Entre ellos, se encuentran los del phylum Ascomycota y Basidiomycota de las clases Basidiomicetes y Ascomicetes así como sus formas imperfectas (Zanni, 2008).

### 3.2. Colonización de los hongos

Para que el hongo pueda colonizar la madera, se requiere que haya oxígeno, temperatura y humedad adecuadas, además del sustrato como fuente de alimento. El hongo se establece en la madera, desarrollando hifas que colonizan rápidamente las paredes celulares y produce transformaciones bioquímicas. Se puede establecer una secuencia en la colonización del hongo. Primero actúan los mohos y hongos cromógenos y luego actúan los hongos de pudrición, degradando así la madera en fases (Gonzales, 2012). Por lo general, los hongos de la pudrición son mesófilos, crecen en un intervalo de 0-45°C y su temperatura óptima es de 20°C a 30°C (Rayner & Boddy, 1998).

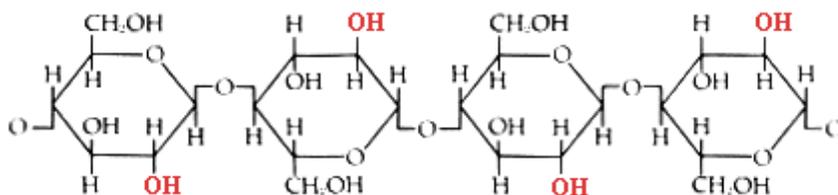
Los hongos actúan cuando la madera se encuentra expuesta a altos contenidos de humedad; por ejemplo madera en contacto con el suelo o cuando las condiciones permiten en la época de lluvia la presencia de altas humedades relativas. Una madera será más sensible a la acción de los hongos cuanto mayor sea su grado de humedad. La madera con un 20% de humedad está expuesta al ataque de hongos, y con un 30% de humedad, éstos se encuentran en un ambiente óptimo donde desarrollarse (Gonzales, 2012).

Los almidones y azúcares, así como algunos de los elementos de las paredes celulares, constituyen su principal fuente de nutrientes. Los hongos pueden desarrollarse en la superficie o en aberturas tales como grietas sobre maderas en condiciones muy desfavorables: humedad relativa muy alta, mala ventilación, contacto directo con el suelo, etc.

### 3.3. Composición y estructura química de la madera

La madera está compuesta por fibras de celulosa, la cual forma una estructura que está rodeada por lignina y hemicelulosa (Gáfaró, 1995). La celulosa es uno de los componentes más importantes de las plantas, ya que constituye la base estructural de las células vegetales y es el biopolímero más abundante sobre el planeta. Se trata de un polímero de elevado peso molecular, formador por de glucosa unidas por enlaces (1-4) beta glucosídicos (Figura 1). Estos enlaces forman cadenas lineales muy estables originando fibras compactas, impermeables al agua y poco susceptibles al ataque químico. Su función es proporcionar rigidez a la pared celular (Nogués, 2010).

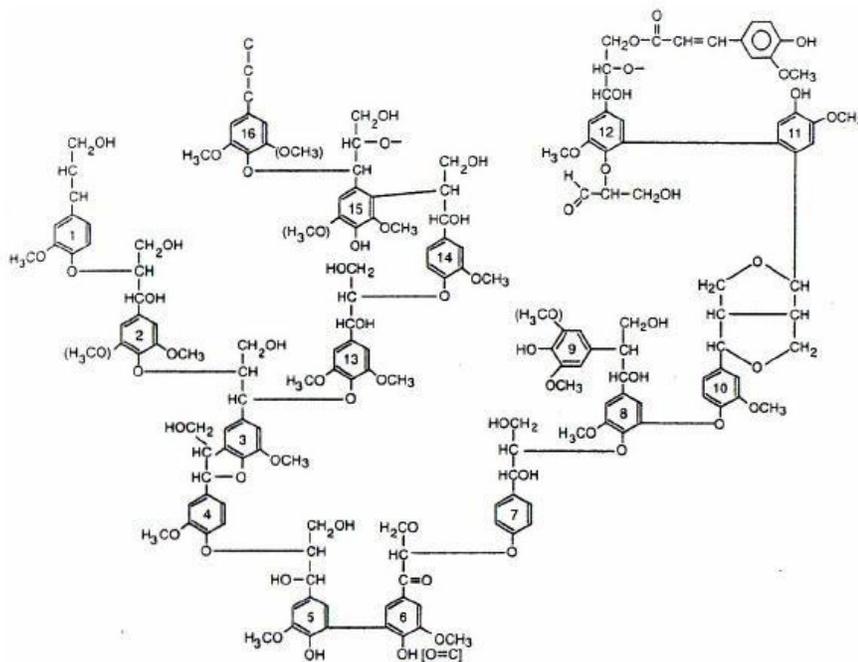
El polímero de celulosa está formado por regiones amorfas y cristalinas. La región amorfa está formada por cadenas de celulosa con organización más reducida y por lo tanto más susceptible al ataque enzimático y químico, mientras que en la región cristalina, se encuentra formando agregados extensos y cristalinos llamados microfibrillas, las cuales están estabilizadas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, la cual le confiere más alta estabilidad química. La mayoría de las cadenas de celulosa tienen un extremo reductor y otro no reductor, es decir, se encuentran polarizadas (Martínez *et al.*, 2005)



**Figura 1.** Esquema de la molécula de celulosa mostrando los enlaces  $\beta$ -1,4.  
Fuente: Ovando-Chacón y Waliszewski (2005).

La lignina es el segundo compuesto más abundante después de la celulosa. Es resistente a la degradación por muchos microorganismos, y de hecho su función principal

en la pared celular de la madera, es proteger los carbohidratos del ataque microbiano y proporcionar rigidez a la pared celular. Actúa como elemento de unión de las fibras de celulosa (Taiz, 2006). Químicamente, es el polímero tridimensional amorfo constituido a partir de unidades de fenilpropano (Figura 2) (Nogués,2010).



**Figura 2.** Esquema de la molécula de lignina compuesta por unidades repetidas de alcoholes p-cumaril, coniferil y sinapil.

**Fuente:** Pentilla & Saloheimo (1999)

La hemicelulosa, forma cadenas cortas y ramificadas, compuestas por diferentes monómeros entre los cuales están las hexosas, pentosas, ácidos urónicos y xilano. El xilano consta de una cadena principal de xilopiranos (xilosa), unidos por enlaces  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4, con ramificaciones de unidades de azúcares y grupos acetilo (Martins *et al.*, 2011). El xilano constituye el 70% de la hemicelulosa, siendo el principal componente de ésta (Dashtban *et al.*, 2009). La naturaleza ramificada de la hemicelulosa la hace amorfa y más fácil de hidrolizar que la celulosa (Nogués, 2010).

### 3.4. Tipos de pudrición de la madera.

Los hongos causan tres tipos de pudrición de la madera: blanca, blanda y café. Cada tipo de pudrición afecta de una manera diferente los componentes de la estructura de la madera, por lo que es factible determinar el tipo de pudrición causada por un hongo usando algunas pruebas de laboratorio (Deacon, 2002).

#### *Pudrición blanda*

Causada por hongos pertenecientes a los Ascomycota y Deuteromycota. Estos hongos degradan la madera superficialmente, la cual se vuelve débil, húmeda y esponjosa (Saldarriaga, 2001). Algunos hongos causantes de este tipo de pudrición son *Chaetomium globosum* y *Daldinia concentrica* (Moore-Landecker, 1996).

#### *Pudrición blanca*

Causada por hongos pertenecientes a los Basidiomycota. Los hongos degradan la lignina rápidamente. La madera toma una apariencia blanquecina húmeda y esponjosa y en etapas avanzadas, la madera se debilita totalmente. La apariencia de la pudrición blanca es fibrosa debido a que gran parte de la celulosa permanece intacta. El color blanquecino ocurre por la oxidación y pérdida de la lignina, la cual es ligeramente café. Como ejemplo de los hongos que causan la pudrición blanca están *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Martínez *et al.*, 2005).

#### *Pudrición café*

También es causada por hongos pertenecientes a los Basidiomycota. Son hongos que degradan la hemicelulosa y la celulosa. La madera toma un color café oscuro debido a la degradación de la celulosa que es blanca, quedando el color café de la lignina residual. El peso específico del leño disminuye, aumentando la retención de agua (Gonzales, 2012). Entre los hongos que causan la pudrición café está *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustres* y *Gloeophyllum trabeum* (Markham y Bazin, 1991). La madera pierde rápidamente sus propiedades de solidez y experimenta roturas drásticas. En estados avanzados la madera es reducida a trozos amorfos, blandos, castaños, cúbicos, compuestos mayormente de lignina ligeramente modificada. La pudrición café consume celulosa, sin atacar la lignina, sus

enzimas cortan las cadenas de los polisacáridos, haciendo que el grado de polimerización de la celulosa disminuye rápidamente. Al microscopio su ataque se caracteriza por la perforación de agujeros, que atraviesan la fibra de lado a lado, sin que se note una disminución del grosor de las paredes de la célula (Gonzales, 2012).

### **3.5. Actividad enzimática de los hongos de pudrición.**

La degradación de madera se da por la actividad enzimática de un complejo de enzimas ligninolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas, importantes dentro del ciclo del carbono (Álvarez *et al.*, 2014).

#### **3.5.1 Lignina y enzimas ligninolíticas**

La degradación de la lignina es un prerrequisito para acceder a los carbohidratos de la pared celular y utilizarla como fuente de carbono y energía (Aro *et al.*, 2005), mediante un complejo de enzimas ligninolíticas como la Lignina peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP) y Lacasas (Lac) que catalizan las reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas (Cullen & Kersten, 2004). Luego hay una incorporación de estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo que dan como producto final CO<sub>2</sub> (Papinutti, 2003).

Las enzimas ligninolíticas actúan efectivamente cuando el sustrato tiene una alta relación carbono-nitrógeno (Rayner & Boddy, 1998). La expresión de estas enzimas también se encuentra condicionada por nutrientes como el nitrógeno, el manganeso y el cobre (Godio *et al.*, 2000).

#### **3.5.2 Hemicelulosa y hemicelulasas**

La ruptura hidrolítica de la hemicelulosa requiere al menos de siete enzimas, debido a la heterogeneidad del compuesto. Su completa degradación requiere la acción cooperativa de enzimas hidrolíticas llamadas hidrolasas (Dashtban *et al.*, 2009). Entre las principales enzimas xilanasas están: endo-1,4- $\beta$ -xilanasas que genera xilo-oligosacáridos al hidrolizar los enlaces  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 glucosídicos de la cadena principal del xilano y la 1,4- $\beta$ -xilosidasa que produce xilosa de xilobiosa y de cadenas cortas de xilooligosacáridos. Entre las enzimas accesorias se encuentran  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ - glucoronidasa, acetil xilano esterasa, esterasa del ácido ferúlico y la  $\alpha$ - galactosidasa (Martins *et al.*, 2011).

### 3.5.3 La celulosa y las celulasas

Los hongos son capaces de hidrolizar la celulosa quedando disponibles las moléculas de glucosa como fuente de energía, esta hidrólisis es realizada por enzimas denominadas celulasas (Álvarez *et al.*,2014).

Cada complejo de celulasas está compuesto por una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para degradar la celulosa (Figura 3). Las enzimas del complejo de celulasas han sido agrupadas en tres componentes principales: endo- $\beta$ -glucanasa o 1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolasas, exo- $\beta$ -glucanasas o 1,4- $\beta$ -D glucan celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas o celobiasas (Ferrer *et al.*,2011).

Las endo- $\beta$ -glucanasa o 1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolasas (E.C.3.2.1.4) hidrolizan aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -glucosídicos en el interior de las moléculas de celulosa, con una rápida disminución del largo de las cadenas y un incremento en los grupos reductores. Como complemento, las exo- $\beta$ -glucanasas o 1,4- $\beta$ -D glucan celobiohidrolasas (E.C.3.2.1.91), atacan los extremos terminales no reductores de la celulosa previamente fragmentada, liberando subunidades de celobiosa. Esta es escindida por las  $\beta$ -glucosidasas o celobiasas (E.C.3.2.1.21), en dos moléculas de glucosa libre (Ferrer *et al.*, 2011). El rompimiento de la celulosa raramente ocurre como un evento aislado; sino como un ataque complejo implicando celulosa, lignina y hemicelulosa. Es esencial la acción combinada de enzimas extracelulares con especificidades complementarias (Gonzales, 2012).

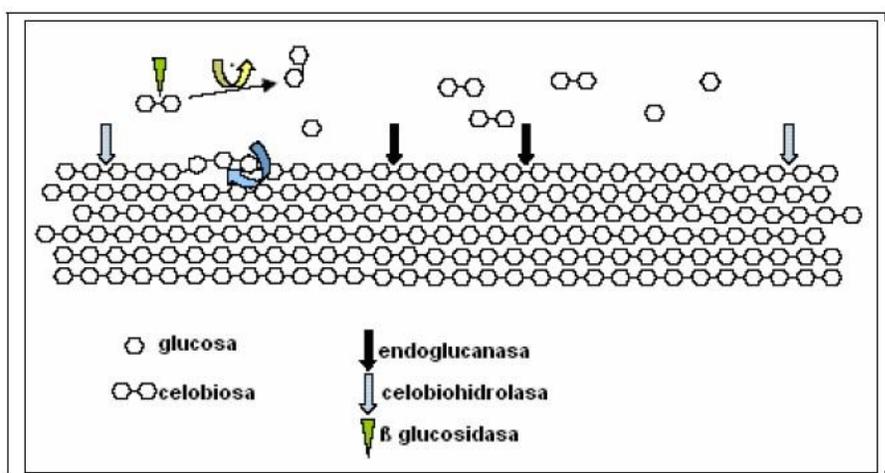


Figura 3. Degradación de la celulosa. Se muestran los sitios de actividad de las enzimas hidrolíticas de la celulosa.

**Fuente:** Aro *et al.*, 2005

Las reacciones catalizadas por enzimas incrementan su velocidad conforme se incrementa la temperatura hasta cierto valor luego del cual comienza su disminución por la desnaturalización de la proteína, para el complejo enzimático celulolítico la máxima actividad es próxima a los 60 °C, con un pH óptimo de 5 (Albarrán, 2008).

### **3.6. Obtención de enzimas celulasas mediante fermentación sumergida**

Se han estudiado varias técnicas para optimizar el proceso de fermentación, ya sea mediante el mejoramiento del microorganismo o selección de medios óptimos, así como el control de diversos parámetros que determinan el crecimiento y producción del microorganismo. Entre las fermentaciones usadas para la obtención de enzimas celulasas tenemos: la fermentación sumergida y la fermentación en estado sólido. La fermentación sumergida involucra aquellos procesos que se realizan con agentes biológicos (García *et al*, 2004), y posee dos ventajas: (a) debido a que presenta una cantidad determinada de sales minerales y agua en una proporción mayor que el sustrato sólido, existe un mayor contacto con el medio; y (b) este tipo de fermentación es usada para la producción de enzimas debido a que la suspensión líquida obtenida con las enzimas hace más fácil la concentración del producto.

Además la fermentación sumergida necesita de agitación, lo cual permite mezclar el cultivo de forma homogénea y aumentar la transferencia del gas a la biomasa.

### **3.7. Factores que afectan la producción de celulasas**

#### *La fuente de carbono*

La selección del sustrato debe realizarse de acuerdo al tipo de microorganismo y tipo de enzima que se requiera, por ejemplo, para producir celulasas y xilanasas se puede seleccionar sustratos que contengan porcentajes elevados de celulosa y hemicelulosa (Vásquez, 2013).

#### *El pH y la temperatura*

En los estudios de optimización, el pH se ha tomado en cuenta como una variable

relevante del proceso, debido a que puede afectar los niveles de producción de enzimas celulasas, dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima. Por otro lado, conforme la temperatura aumenta, las velocidades de las reacciones químicas, enzimáticas y de crecimiento, se vuelven más rápidas. Sin embargo, hay un límite de temperatura dentro del cual las funciones metabólicas pueden ocurrir y cuando éste se sobrepasa, las funciones empiezan a decaer drásticamente (Vásquez, 2013).

### **3.8. Determinación de la actividad celulolítica**

Para la determinación de la actividad celulolítica se utilizan medios líquidos que contienen celulosa, mediante el estudio de la hidrólisis de los sustratos celulósicos, se puede estimar los microorganismos degradadores de celulosa. Entre las pruebas cuantitativas tenemos: la técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y el método de glucosa oxidasa (Trinder, 1969)..

#### *Técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)*

La actividad celulolítica puede medirse determinando la cantidad de grupos reductores generados, producto de la degradación de la celulosa, mediante la técnica del DNS. Esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa y oligosacáridos (Miller, 1959).

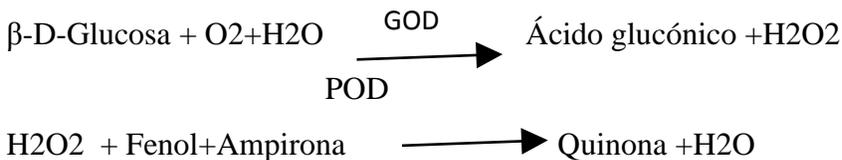
En este método, el ácido 3,5- dinitrosalicílico es reducido a ácido 3- amino-5- nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos. La reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro lo que implica la aplicación de la ley de Beer Lambert (Miller, 1959).

La determinación por la prueba de DNS es altamente influenciada por las mismas condiciones de la prueba, como la temperatura de agua del calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, la proporción de glucosa, celobiosa y celodextrinas, entre otras

(Zhang *et al.*, 2006).

### *Método de glucosa oxidasa*

Según Trinder (1969) la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido, se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



Esta reacción produce un complejo de color rosado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

### **3.9. Precipitación de enzimas**

Un paso importante para la producción de enzimas es conseguir la obtención de complejos purificados con una máxima actividad. Para ello se hacen precipitar las proteínas presentes en el medio de cultivo, lo cual se logra mediante la adición de un agente precipitante que produce un agregado suelto que puede eliminarse fácilmente por centrifugación o filtración (Chaplin, 2014).

Se han usado diferentes agentes que permiten obtener precipitados de las proteínas bajo diferentes principios maximizando su actividad enzimática. Entre ellas destacan:

(a) Precipitación por disminución de la solubilidad utilizando sulfato de amonio, (b) precipitación isoelectrica, (c) precipitación con polímeros no iónicos, (d) precipitación por desnaturalización selectiva, (e) precipitación por afinidad y (f) precipitación con disolventes, esta última técnica se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un solvente orgánico ligeramente polar como etanol, metanol, acetona, benceno y hexano (Chaplin, 2014).

La adición de un solvente orgánico (etanol) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas

opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta (Farinas *et al.*, 2011).

### **3.10. Aplicaciones ecológicas y biotecnológicas de los hongos degradadores de la madera.**

Los hongos están especializados para usar la biomasa vegetal como fuente de carbono mediante la producción de enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas en azúcares metabolizables. Las enzimas que despolimerizan los polisacáridos en las plantas son de gran interés para la biotecnología, ya que los productos de su catálisis pueden utilizarse como precursores en los procesos que generan productos de origen biológico, por ejemplo, combustibles, papel, alimentos, piensos y productos químicos (Rytioja *et al.*, 2014).

Se han identificado muchos hongos degradadores de polímeros entre ellos *Penicillium*, *Aspergillus* y *Paecilomyces*, los cuales tienen la capacidad de degradar Poli (3-hidroxi-butirato) P3HB, el cual es un termoplástico con propiedades similares al polipropileno, se usa principalmente para técnicas de moldeo. Con base en las propiedades físicas de los P3HB que se conocen hasta el momento, éste podría utilizarse como sustituto de algunos plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y el polietileno y su uso ha sido enfocado como materia prima para fabricar productos desechables biodegradables. La capacidad de los hongos para degradar P3HB ha sido evaluada en función de su afiliación sistemática encontrando que miembros de basidiomicetos, deuteromicetos, ascomicetos, zigomicetos, quitridiomicetos y mixomicetos son capaces de degradar P3HB (González *et al.*, 2013).

Algunos hongos pueden producir enzimas que pertenecen al grupo de los oxidadores de fenoles y constituyen una de las clases más prometedoras de enzimas para su uso futuro en diversos ámbitos, entre ellas, las lacasas; las cuales son producidas por el basidiomiceto degradador de madera *Cerrena unicolor* C-139. Para fines industriales y biotecnológicos, las lacasas se encuentra entre las primeras enzimas que proporcionan aplicaciones a gran escala, tales como la eliminación de los polifenoles o conversión de compuestos tóxicos (Kucharzyk *et al.*, 2012)

#### 4.-ANTECEDENTES

Se ha logrado aislar hongos de muestras de tierra, aserrín y madera en descomposición y estudiado su actividad celulasa y xilanasa, encontrando mayor actividad en *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp., los cuales fueron los que tuvieron mayor ocurrencia relativa en las tres muestras (Karegoudar *et al.*, 2013). Las actividades celulolíticas de los hongos aislados fueron determinados mediante la estimación de la cantidad de azúcares reductores liberados por los hongos cuando se cultiva en carboximetilcelulosa (CMC). La actividad celulasa más alta (1,23 U/mg) fue encontrada en *Trichoderma* sp.

El análisis de la actividad celulasa presente en hongos aislados de bagazo de caña fue realizado por Ferrer *et al.*, (2011); quienes usando fermentaciones de aislados preseleccionados y suplementando el medio con urea y sales de amonio y usando papel de filtro 1% (p/v) como única fuente de carbono, determinaron la actividad celulasa en función de los azúcares reductores liberados (glucosa), obteniéndose la mayor concentración de glucosa de 600 mg/L, en hongos incubados durante 72 horas sin agitación a 30°C.

Chaparro y Rosas (2006), evaluaron hongos de pudrición blanca pertenecientes al Phylum Ascomycota y Basidiomycota, encontrados con mayor frecuencia en troncos caídos con diferentes estados de descomposición, con el fin de conocer la capacidad enzimática de estos hongos y su relación con el estado de descomposición en los troncos colonizados. Se encontró que los hongos basidiomycota *Earliella* sp presenta un patrón diferente a los hongos del Phylum Ascomycota (*Cookeina sulcipes* y *Xylaria polymorpha*) en cuanto a su actividad celulolítica durante la producción de biomasa. En los hongos Basidiomycota, el consumo de glucosa es mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa. En el phylum Ascomycota, su actividad celulolítica es mayor con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento.

Se han realizado estudios del hongo *Fomes fomentarius* presente comúnmente en la madera podrida, una especie capaz de descomponer eficientemente la madera. El hongo produjo un conjunto de enzimas degradadoras de madera tales como endo-1,4-β-glucanasa, 1,4-β- glucosidasa, celobiohidrolasa, endo-1,4-β-xilanasa, 1,4-β-xilosidasa, Mn peroxidasa y

lacasa. El objetivo estudio fue caracterizar y purificar la 1,4 principal de este  $\beta$ -glucosidasa producido por *F. fomentarius*, se obtuvo una producción de dicha enzima de 25,9 U/mL. La combinación de masa molecular relativamente baja (58 kDa) y su bajo valor  $K_m$  (15,8 mol/min L) hacen que la 1,4- $\beta$ -glucosidasa sea una enzima prometedora para aplicaciones biotecnológicas (Větrovský *et al.*, 2013)

Se han realizado estudios sobre *Piptoporus betulinus*, el cual es un hongo de la madera en pudrición común para el abedul (*Betula* sp.), produce principalmente  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -manosidasa en sus cuerpos fructíferos, mientras que se encuentran las actividades más altas de endoglucanasa, endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasa en madera con el hongo-colonizado. Este trabajo muestra que *P. betulinus* es capaz de realizar rápidamente la hidrólisis de la lignocelulosa, debido a sus enzimas hidrolíticas con especificidades de sustrato relativamente amplias. El hongo exhibe una alta tasa de degradación del sustrato acompañado de una alta producción de enzimas hidrolíticas, lo que lo hace interesante para ser utilizado en procesos biotecnológicos (Valášková & Petr, 2006).

## **5.-MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Área de muestreo**

La toma de muestras se realizó en una parcela productora de cacao, ubicada en Trincheras, Municipio Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela (19N 599312E y 1139348N). Adicionalmente, se tomaron muestras de madera en descomposición de un tronco en el Campus de Bárbula, en la plaza cercana al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo.

### **5.2. Recolección de ejemplares**

Se tomaron muestras de hongos presentes en troncos caídos en descomposición. También se tomaron muestras de carpóforos. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico selladas, llevadas al laboratorio y refrigeradas hasta su procesamiento.

### **5.3. Aislamiento y condiciones de cultivo**

Las muestras de madera en descomposición, fueron trituradas manualmente dentro de la bolsa de recolección para posteriormente realizar suspensiones del material en agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas desde 1/10 y hasta 1/10<sup>-5</sup>. Las diluciones fueron sembradas en placas con agar nutritivo con y sin antibióticos (amoxicilina y ciprofloxacina, 1 mg/mL c/u). La muestra del carpóforo se desinfectó superficialmente con etanol al 70 % y algunos trozos fueron colocados en placas con agar nutritivo con antibióticos. Las placas fueron incubadas por 5 días a temperatura ambiente. Los morfotipos fueron aislados y se realizaron caracterizaciones de las colonias y observaciones microscópicas. Los morfotipos fueron mantenidos por subcultivo en medios agar papa dextrosa (PDA).

### **5.4. Residuos de la industria papelera.**

Se utilizó como sustrato para la fermentación, un residuo de la industria papelera conocido como lodo paplero, proveniente de una planta procesadora de papel de Venezuela, los mismos se colocaron en una estufa a 60 °C por tres días y posteriormente en un desecador hasta alcanzar a temperatura ambiente.

## **5.5. Fermentaciones sumergidas del aislado fúngico para obtención de enzimas celulasas.**

### **5.5.1. Condiciones de la fermentación.**

Todos los medios de fermentaciones (descritos posteriormente) contenían lodo papelerero (fibras de celulosa) como fuente de carbono y sales minerales Nitrosol-P<sup>®</sup> y Nitrosol- K<sup>®</sup>. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El sistema fue incubado a temperatura ambiente y en agitación rotatoria (90 rpm), durante 48 horas, para luego realizar una incubación postfermentativa a 40 °C sin agitación por 24 horas. Finalmente, se determinó la cantidad de glucosa (actividad celulasa) en el sobrenadante antes y después de incubar a 40 °C.

### **5.5.2. Evaluación preliminar de la actividad.**

Con los morfotipos aislados se realizaron fermentaciones en medio con lodo papelerero y sales minerales al 1 %. El morfotipo aislado con mayor actividad celulasa (mayor producción de glucosa a partir de las fibras de celulosa del lodo papelerero), fue utilizado en los subsiguientes ensayos.

### **5.5.3. Efecto de la disgregación de la fuente de carbono**

Para evaluar si la disgregación del medio aumenta la concentración de glucosa obtenida (actividad celulasa), se prepararon dos medios de cultivo con lodo papelerero y sales minerales al 1 %; a un medio se le disgregó el lodo papelerero en una licuadora Oster<sup>®</sup> (Centeno y Pavone, 2015), mientras que el otro se dejó sin disgregar.

### **5.5.4. Efecto de la concentración de la fuente de carbono.**

Se varió la concentración de la fuente de carbono (lodo papelerero) 0,5; 1; 2 y 3 % p/v, el cual fue disgregado y suplementado con sales minerales Nitrosol-P<sup>®</sup> y Nitrosol- K<sup>®</sup> al 1%. Se determinó la actividad celulasa.

### **5.5.5. Efecto de la concentración de las sales minerales.**

Se varió la fuente de sales minerales, Nitrosol P<sup>®</sup> y Nitrosol K<sup>®</sup>, (0; 0,5; 1; 2 y 3

%), manteniendo la fuente de carbono (lodo papelerero) a la concentración óptima obtenida en el ensayo de efecto de la concentración de fuente de carbono y las mismas condiciones de la fermentación. Se determinó la actividadcelulasa.

#### **5.5.6. Efecto del pH.**

Se varió el pH del medio de cultivo, utilizando una solución de NaOH 1M (Chen *et al.*, 2013), obteniendo medios de cultivos con pH de 4, 5 y 6. Se mantuvo la concentración óptima de sales y lodo papelerero obtenida en ensayos anteriores y las mismas condiciones de la fermentación. Se utilizó un medio control, al cual no se le varió el pH. Se determinó la actividadcelulasa.

#### **5.5.7. Efecto del tiempo de incubación postfermentativa.**

Con las condiciones óptimas obtenidas de concentración de fuente de carbono, sales minerales, pH y tiempo de agitación, se procedió a evaluar el tiempo de incubación postfermentativa a 40 °C, necesario para obtener la mayor actividad celulasa. Para ello, se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) y se les determinó la cantidad de glucosaobtenida.

#### **5.5.8. Efecto de la temperatura de incubación postfermentativa.**

Con todas las condiciones optimizadas se procedió a variar la temperatura de incubación postfermentativa. Se determinó la cantidad de glucosa obtenida a varias temperaturas (ambiente, 40, 50 y 60 °C) durante 24 horas.

#### **5.5.9. Efecto del tiempo de fermentación**

Con las condiciones óptimas obtenidas, se evaluó el tiempo de agitación antes de incubar a 40 °C sobre el proceso. Para ello, se tomaron muestras a diferentes tiempos de agitación, cada 48 horas por 2 semanas. A cada muestra se le determinó la cantidad de glucosa antes y después de la incubación a 40 °C (actividad celulasa)

### **5.6. Determinación de azúcares reductores (glucosa) como medida de actividad celulasa.**

Para la determinación de glucosa se usó el método de glucosa oxidasa GOP-PAP de

determinación cuantitativa de glucosa (Trinder, 1969). Se tomaron muestras (2 mL) de los medios de cultivo en las condiciones evaluadas. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min, para separar la biomasa fúngica y partículas en suspensión. Al sobrenadante se le determinó la cantidad de glucosa mezclando 20  $\mu$ L del mismo con 0,5 mL de solución del reactivo del kit Glucosa oxidasa (Biosciences). Las determinaciones se realizaron por quintuplicado. También se realizó una muestra patrón con 20  $\mu$ L de la solución patrón y 0,5 mL de reactivo del kit. Las muestras se incubaron a 37 °C por 10 minutos y se determinó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic modelo Genesys 2.0.

### **5.7. Precipitación de enzimas celulasas**

De los cultivos sumergidos obtenidos de las condiciones óptimas para la obtención de las enzimas celulasas, se distribuyó el volumen deseado del caldo fermentado en tubos Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, se agregó etanol hasta que alcanzó la concentración final deseada, según el siguiente esquema: 1 mL de muestra en 1 mL de etanol (50%); 0,5 mL de muestra en 1,5 mL de etanol (75%); 1,5 mL de muestra en 0,5 mL de etanol (25%) y un grupo control sin etanol. Las muestras se homogeneizaron por inversión, se incubaron a -15°C por 24 horas (Ghose, 1987). Finalmente, se determinó la actividad celulasa, en los precipitados correspondiente a cada tratamiento.

### **5.8. Determinación de la actividad celulasa de los precipitados.**

Luego de la incubación, las muestras fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, los precipitados obtenidos (25%, 50% y 70%) se resuspendieron en 100 $\mu$ L de agua destilada estéril con 100 $\mu$ L de carboximetilcelulosa al 0,25% disuelto en 100  $\mu$ L de solución buffer citrato 0,05 M pH 4,8 (Ghose, 1987), para obtener un volumen de reacción de 200  $\mu$ L. De esta mezcla se tomaron 100  $\mu$ L y se determinaron los azúcares reductores iniciales y los restantes 100  $\mu$ L fueron incubados por 24 horas a 45 °C. La actividad enzimática fue reportada como la diferencia entre la cantidad de glucosainicial y final, en términos de  $\mu$ moles de glucosa/mL.h. Las mediciones se realizaron por quintuplicado

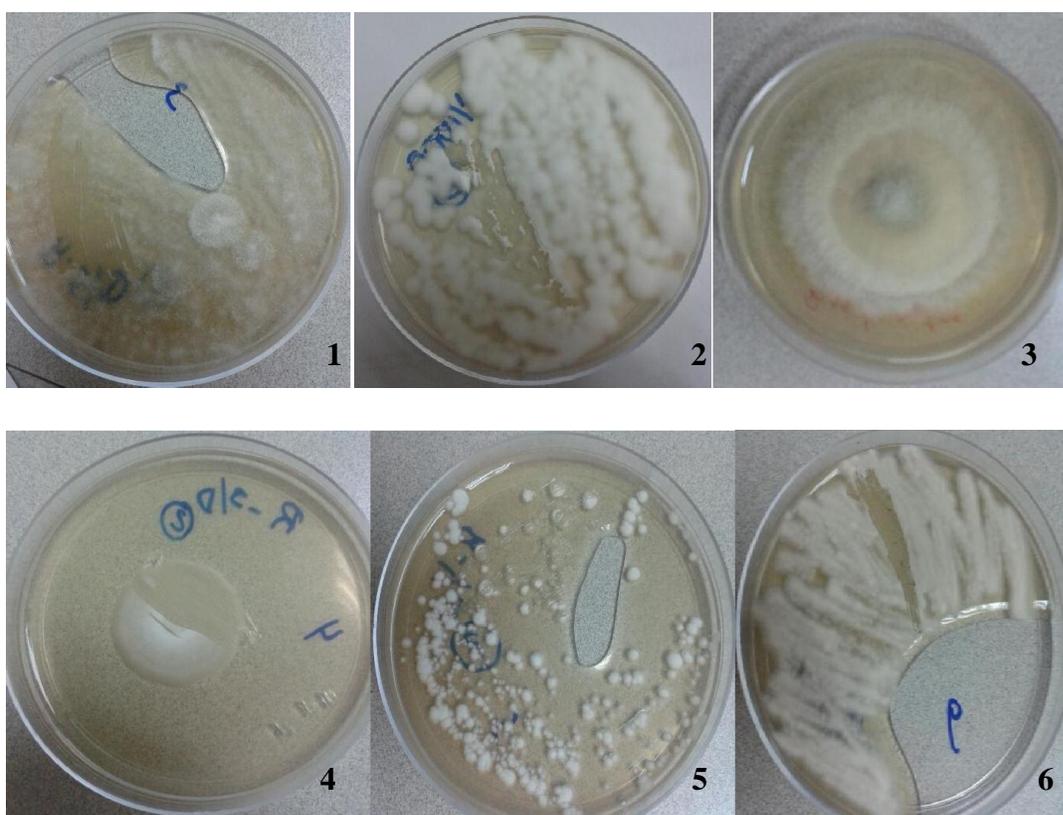
## **5.9. Análisis estadísticos.**

Para determinar diferencias entre los tratamientos, los datos fueron sometidos a una prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis y Mann Whitney por no poseer normalidad. Los valores de los gráficos representan los promedios de cinco repeticiones.

## 6.- RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Obtención de los aislados fúngicos.

El primer paso en la experimentación de este trabajo, se basó en la obtención de aislados fúngicos a partir de madera en descomposición, con la finalidad de probar la capacidad celulolítica de los mismos. A partir de las muestras de madera en descomposición, se obtuvieron seis aislados fúngicos, los cuales se observan en la Figura 4.

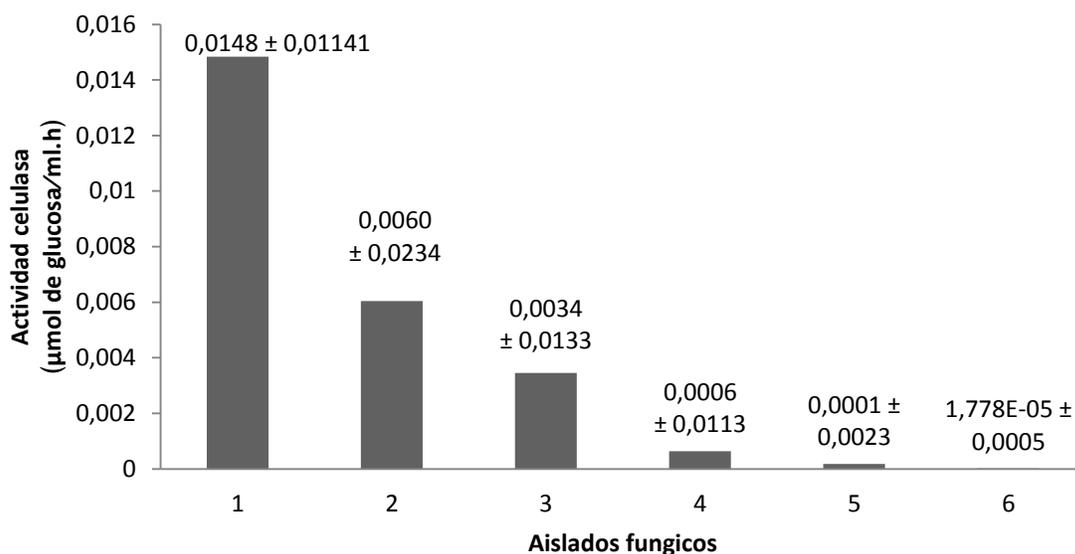


**Figura 4.** Aislados fúngicos obtenidos a partir de las muestras de madera en descomposición, en medio PDA.

En los resultados obtenidos, puede apreciarse seis morfotipos diferentes, todos pertenecientes al Reino Fungi. Algunas cepas como la 4, posee un crecimiento poco extendido en la placa, mientras que cepas como la 3 y la 6, la colonizaron casi por completo.

## 6.2. Evaluación preliminar de la actividad celulasa en los aislados fúngicos

A partir de los aislados obtenidos, se realizaron pruebas preliminares para conocer cuál de éstos poseía la mayor capacidad celulolítica. En la Figura 5 se observa que el aislado fúngico 1 alcanzó la máxima actividad celulasa con rendimientos de  $0,0148 \pm 0,01140$   $\mu$ moles de glucosa/mL.h. El análisis estadístico (Apéndice. Tabla I) arrojó un p valor 0,05; indicando la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, corroborando que con el aislado 1, se obtiene la mayor actividad celulasa bajo las condiciones estudiadas. Dicho aislado se eligió para los posteriores ensayos.



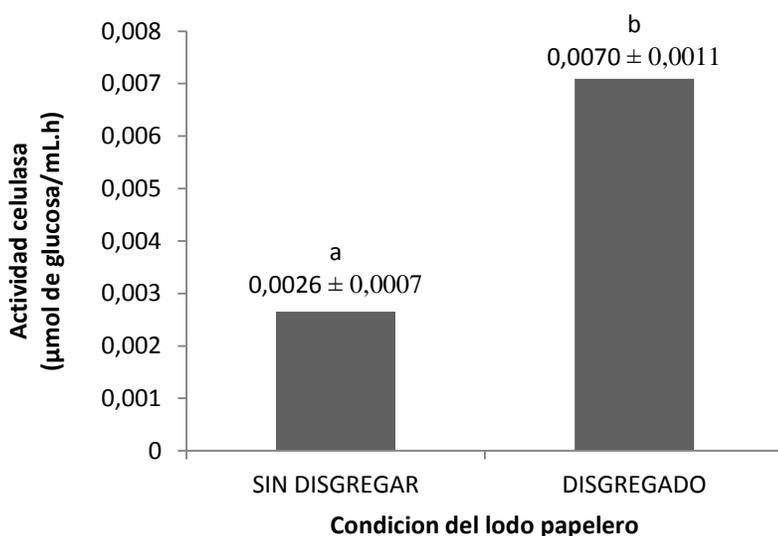
**Figura 5.** Evaluación preliminar de la actividad celulasa en los aislados fúngicos a los 5 días de fermentación. Los tratamientos con letras distintas poseen diferencias significativas entre sí.

Los rendimientos de actividad celulasa parecen depender de una relación compleja que involucra una variedad de factores como el pH, temperatura, período de incubación, los cationes, carbono y fuentes de nitrógeno (Gautam *et al.*, 2011). Es importante señalar que la actividad celulasa reportada en este trabajo, no discrimina entre los diferentes tipos de celulasas que existen. Si bien se determina la actividad  $\beta$ -glucosidasa directamente (al ser expresada dicha actividad en términos de glucosa producida), se asume que de forma indirecta, se evalúa la actividad celulasa total, ya que la única fuente de carbono en el

medio es la celulosa, debido a que los resultados de cantidad de glucosa antes de la fermentación, arrojaron la inexistencia de esta fuente de carbono (datos no mostrados).

### 6.3. Efecto de la disgregación del lodo papelerero como fuente de carbono

El tamaño de la partícula del lodo papelerero afecta la producción de enzimas, ya que es un factor importante para la accesibilidad del hongo al sustrato, mientras más accesible esté el sustrato, más fácil será degradarlo. De esta forma, utilizando el aislado fúngico 1 se procedió a disgregar el lodo papelerero y se obtuvo una actividad celulasa de  $0,0070 \pm 0,0011$   $\mu\text{mol}$  de glucosa/mL.h a las 24 horas obteniéndose un menor rendimiento con el lodo no disgregado con valores de  $0,0026 \pm 0,0007$   $\mu\text{moles}$  de glucosa/mL.h (Figura 6).



**Figura 6.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu\text{moles}$  de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelerero al 1% disgregado y sin disgregar a las 72 horas de fermentación.

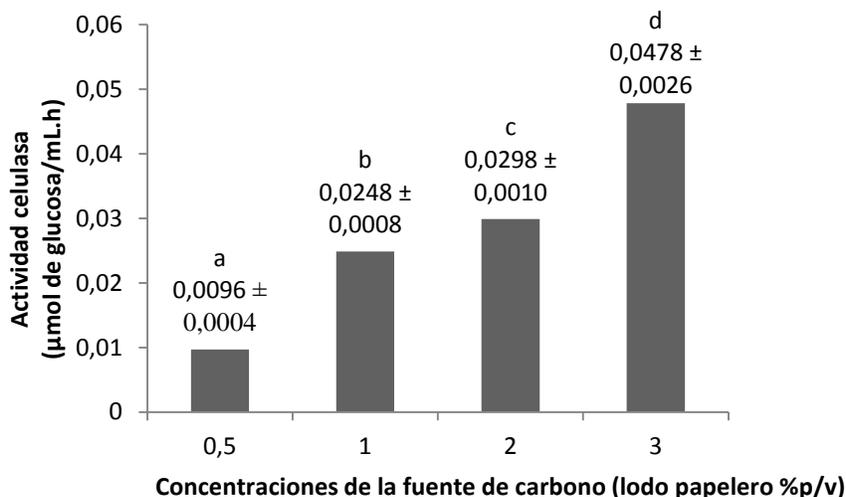
El análisis estadístico (Apéndice. Tabla II) comprobó la existencia de diferencias significativas entre la actividad con el lodo papelerero disgregado y sin disgregar.

Según investigaciones de Centeno & Pavone (2015) las mayores actividades enzimáticas se obtuvieron con el lodo disgregado ( $2,64 \pm 0,04$  mg de azúcares

reductores/L.h) en comparación con el tratamiento no disgregado ( $2,29 \pm 0,27$  mg de azúcares reductores/L.h), coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio. De esta forma, la disgregación del lodo incrementa el rendimiento en actividad celulasa, ya que al estar disgregado, el hongo puede digerirlo fácilmente.

#### 6.4. Efecto de la concentración de la fuente de carbono

La concentración de la fuente de carbono es un factor muy importante en el desarrollo de la fermentación, ya que determina la cantidad de sustrato que el hongo tendrá disponible para su crecimiento. Así, se evaluó la variación de la concentración de lodo papelerero sobre la actividad celulasa. Los resultados se muestran en la Figura 7, donde se observa que a medida que se va aumentando la concentración de fuente de carbono, también aumenta la actividad celulasa, hasta alcanzar su máximo valor a una concentración de 3% ( $0,0478 \pm 0,0026$   $\mu$ moles de glucosa/mL.h) a las 72 horas de fermentación. La menor actividad celulasa se obtuvo al utilizar 0,5% de lodo papelerero ( $0,0096 \pm 0,0004$   $\mu$ mol de glucosa/mL.h). Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí (Apéndice. Tabla III).

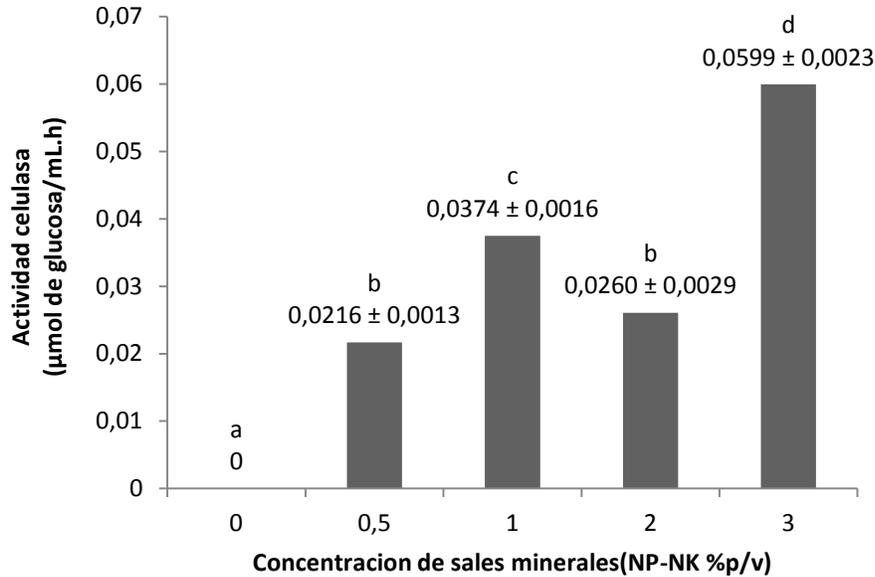


**Figura 7.** Actividad celulasa en medios con lodo papelerero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones (0,5%, 1%, 2% y 3%).

Las actividades enzimáticas usando diferentes sustratos varían de acuerdo a su concentración, Mohammed & Fagade (2010) obtuvieron una actividad máxima utilizando Carboximetil celulosa (CMC) como fuente de carbono al 1%. Igualmente se han determinado actividades de 0,89 U/mL, específicamente  $\beta$ -glucosidasa en una concentración de salvado de arroz de 0,5% utilizando *A. niger* (Sridevil *et al.*, 2011). Por su parte, Ojumu *et al.* (2003) reportó una alta actividad celulasa con *A. flavus* usando como sustrato aserrín pretratado (0,0743 IU/mL) mientras que del bagazo y el maíz se obtuvo 0,0573 y 0,05 IU/mL, respectivamente.

### **6.5. Efecto de la concentración de las sales minerales**

Las sales minerales son esenciales en el proceso fermentativo, debido a que le aporta al microorganismo elementos esenciales para su desarrollo como nitrógeno, fósforo, etc. En este sentido es muy importante no solo la cantidad sino el tipo de sales incorporadas al medio de cultivo. En este caso, se utilizaron fertilizantes de uso común en agricultura. En la Figura 8, puede apreciarse que la mayor actividad celulasa (0,0599  $\mu$ mol de glucosa/mL.h), se obtuvo utilizando 3% de sales minerales (Nitrosol P<sup>®</sup> y Nitrosol K<sup>®</sup>) a las 72 horas de fermentación, en comparación con el menor rendimiento en el tratamiento sin sales, donde no se detectó actividad celulasa. Estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad celulasa del medio con 0,5 y 2% de sales minerales, mientras que las demás concentraciones sí fueron significativas (Apéndice. Tabla IV).



**Figura 8.** Determinación de actividad celulasa en medios con lodo papelerero disgregado (3%) bajo diferentes concentraciones de sales minerales (0,5; 1; 2; 3 % y control 0%) a las 72 horas de fermentación.

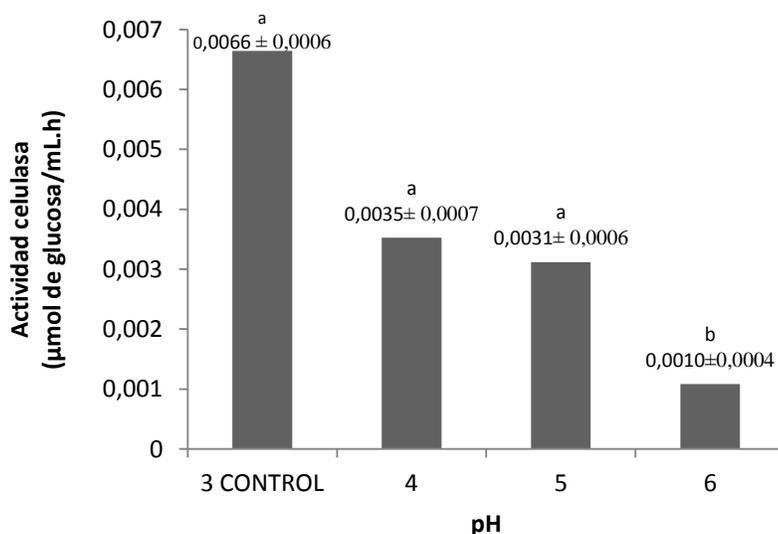
En el estudio realizado por Mohammed & Fagade (2010) se mostró que la presencia de KCl en el medio, mejora la actividad celulasa (10,55 U/ml). Esto indica que el potasio tiene un efecto positivo en la actividad celulasa, esto puede deberse a que el potasio interviene en la maquinaria enzimática. Según Centeno & Pavone (2015) el lodo papelerero es una buena fuente de carbono para obtener azúcares reductores, además de requerir del agregado de sales minerales para la fermentación.

## 6.6. Efecto del pH

El pH de un medio de cultivo influencia el grado de desarrollo del microorganismo, por ello, la optimización de este parámetro es crucial para la obtención de los mayores rendimientos. En la Figura 9, se puede observar que a medida que el pH aumenta, la actividad celulasa disminuye gradualmente. Se obtuvo la mayor actividad celulasa (0,0066 ± 0,0006 µmoles de glucosa/mL.h) en el medio control sin modificación de pH, el

cual se ubicó en un valor de pH de 3. La menor actividad celulasa se obtuvo en el tratamiento con pH 6 ( $0,0010 \pm 0,0004$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ )

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre la actividad celulasa en el medio de pH 3, en comparación con los demás, mientras que las actividades enzimáticas en los medios con pH 4, 5 y 6, no se diferenciaron estadísticamente (Apéndice. Tabla V).



**Figura 9.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ ) en medios con lodo papelerero disgregado a las 72 horas de fermentación bajo diferentes valores de pH (4, 5, 6 y control 3)

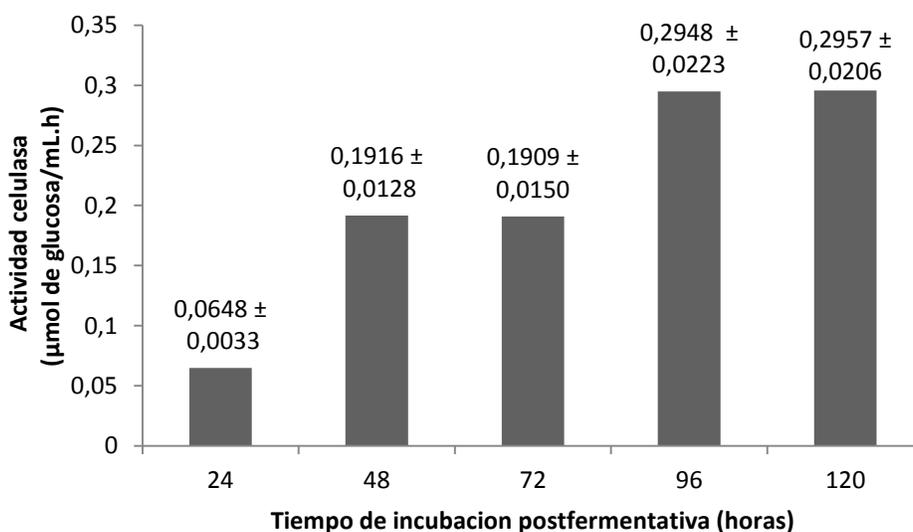
El pH óptimo de 3 obtenido concuerda con los resultados mostrados en el estudio de Pereira *et al.*, (2011). Estos autores utilizando *Trichoderma sp* obtuvieron una actividad celulasa óptima a pH 3,0. Esto indica que estos microorganismos pueden producir enzimas celulasas capaces de actuar en medios ácidos. Esta característica bioquímica podría ser muy interesante para procesos que requieren condiciones ácidas.

Igualmente, en otros estudios se obtuvo una alta producción de enzimas celulasas a pH 4 a partir de una cepa de *A.niger* (Sohail *et al*, 2009). La disminución de la actividad de celulasa a valores de pH mayores puede ser debido a que estas proteínas se desnaturalizan en esas condiciones (Milala *et al.*, 2005). Próximos estudios, determinarán el desempeño de la actividad celulasa a pH inferiores a 3.

En un estudio sobre la producción de celulosa y hemicelulosa con cepas de *A. niger* MSK-7 y *T. viride* MSK-10, se obtuvo un pH óptimo de 5,5 en un medio con CMC (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2006). En otro estudio con *A. niger* YL128 se obtuvo una mayor actividad de celulasa con un pH ácido de 5 (Mohammed & Fagade., 2010).

### 6.7. Efecto del tiempo de incubación postfermentativa

Otro parámetro importante es la incubación postfermentativa a temperatura elevada. En este punto del proceso, se busca detener el crecimiento del hongo y permitir que las enzimas actúen sobre el sustrato, acumulándose glucosa. Al variar el tiempo de incubación postfermentativa, se obtuvo que la mayor actividad celulasa está entre 0,2948 y 0,2957  $\mu\text{mol}$  de glucosa/mL.h a las 96 y 120h a 40°C (Figura 10). El análisis estadístico comprobó que la actividad celulasa a las 24 horas es menor y diferente a las demás, mientras que la actividad a las 48 y 72 horas no poseen diferencias estadísticas entre sí. Finalmente, la actividad a las 96 y 120 horas no presentan diferencias significativas entre sí (Apéndice. Tabla VI).



**Figura 10.** Determinación de actividad celulasa en medios con lodo papelerero disgregado a las 72 horas de fermentación bajo diferentes tiempos de incubación postfermentativa (24, 48, 72, 96 y 120 horas) a 40°C.

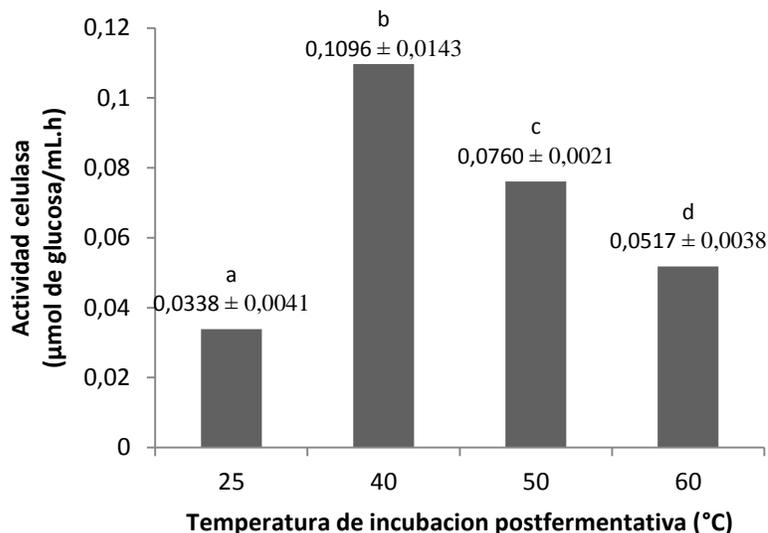
Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Gautam *et al.*, (2011), donde se utilizó *A. niger* con sales minerales e incubado a  $45 \pm 2$  ° C durante un período de 7 días. La actividad celulasa se midió a intervalos regulares. Sin embargo, el rendimiento máximo de exoglucanasa (1,64 U / ml) y endoglucanasa (1,84 / mL U) se obtuvo después de 3-5 días de incubación. La mayor cantidad de glucosa se obtuvo al quinto día. También se ha determinado que los períodos de incubación para alcanzar la mayor actividad celulasa por la cepa de *A. niger* y *Trichoderma* sp. fue de 4 - 6 días (Kang *et al.*, (2004).

En otro estudio, la actividad máxima fue observada a las 72- 96h después de incubar las cepas de *A. niger* MSK-7 y *T. viride* MSK-1 (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2006). Sin embargo, un incremento en el tiempo de incubación, reduce la producción de enzimas debido probablemente a la escasez de micro y macronutrientes en el medio de fermentación, resultando en la inactivación de la maquinaria enzimática del hongo (Nochure et al., 1993).

Sin embargo, los resultados del presente estudio, difieren con otra investigación donde se evaluó la actividad celulasa con una cepa de *A. niger* YL128, con el cual se ha obtenido un pico de producción a los 9 días, es decir, 216 h en incubación a 30°C (Mohammed & Fagade., 2010)

#### **6.8. Efecto de la temperatura de incubación postfermentativa.**

La temperatura de incubación postfermentativa está relacionada con la temperatura óptima de la enzima. La Figura 11, muestra que a una temperatura de 25°C la actividad celulasa es baja ( $0,033 \pm 0,0041$   $\mu$ moles de glucosa/mL.h). A medida que la temperatura se incrementa, también lo hace la actividad celulasa, alcanzado los mayores valores (0,1096  $\mu$ moles de glucosa/mL.h) a una temperatura de 40°C. La actividad celulasa más baja se obtuvo a temperatura de 25°C y 60°C, las cuales son iguales estadísticamente (Apéndice. Tabla VII).



**Figura 11.** Determinación de actividad celulasa ( $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ ) en medios con lodo papelero disgregado a las 72 horas de fermentación en diferentes temperaturas de incubación postfermentativa: 25, 40, 50 y 60°C.

La temperatura de incubación juega un rol importante en las actividades metabólicas de los microorganismos. En el presente estudio, se evaluó un rango de temperatura de 25°C -60°C, teniendo como temperatura óptima 40°C. La baja actividad celulasa a una temperatura de 25°C puede deberse a dos razones fundamentales: (a) el hongo está utilizando la glucosa obtenida para su crecimiento, enmascarando la verdadera actividad o (b) las enzimas requieren mayor temperatura para alcanzar su conformación óptima. Igualmente, la baja actividad celulasa a una temperatura de 60°C, se puede deber a la desnaturalización de las proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura.

En el estudio realizado por Gautam *et al.*, (2011) muestran que la temperatura óptima para exoglucanasa (1,95 U / mL) y la actividad de endoglucanasa (1,88 U / mL) producida por *A. niger* y *Trichoderma sp* fue de entre 40 y 50 ° C. Igualmente la máxima producción celulasa fue observada en un estudio con *A. terreus* QTC 828 con una

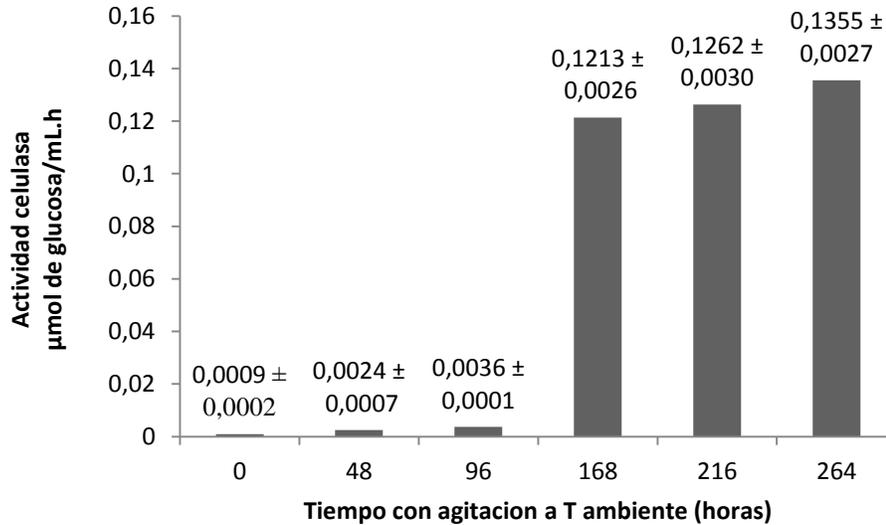
temperatura óptima de 40°C (Ali *et al.*, 1991).

En otro estudio, se obtuvo una temperatura óptima de incubación de 30°C con cepas de *A. niger* MSK-7 y *T. viride* MSK-1 (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2006). Cualquier cambio, bien sea el incremento o disminución en la temperatura resultará en un gradual decrecimiento en la producción de enzimas celulasas. Muchos investigadores han reportado varias temperaturas óptimas para la producción de enzimas celulasas, lo que sugiere este parámetro depende del microorganismo en estudio.

### **6.9. Efecto del tiempo de fermentación**

El proceso fermentativo propuesto en este trabajo, se basa en permitir el desarrollo del hongo en las primeras horas de incubación, para promover la formación y secreción del pool enzimático necesario para degradar la fuente de carbono, para finalmente aumentar la temperatura y permitir que las enzimas producidas puedan ejercer su función, deteniendo el crecimiento del hongo. De esta forma, resulta crucial conocer cuál debe ser este tiempo de incubación, ya que tiempos muy cortos no permitirán la formación de las enzimas y tiempos muy largos, pueden conllevar a la degradación de las mismas. En la Figura 12, puede observarse que el tiempo óptimo de incubación durante la fermentación está entre 168 y 264 horas con una actividad celulasa de 0,1213 y 0,1355  $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ , respectivamente. Se observa además que a partir de las 168 horas la actividad celulasa aumenta considerablemente hasta las 264 horas.

El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en los primeros tres tratamientos (0, 48 y 96 horas) con respecto a los últimos (168, 216 y 264 horas). (Apéndice. Tabla VIII).



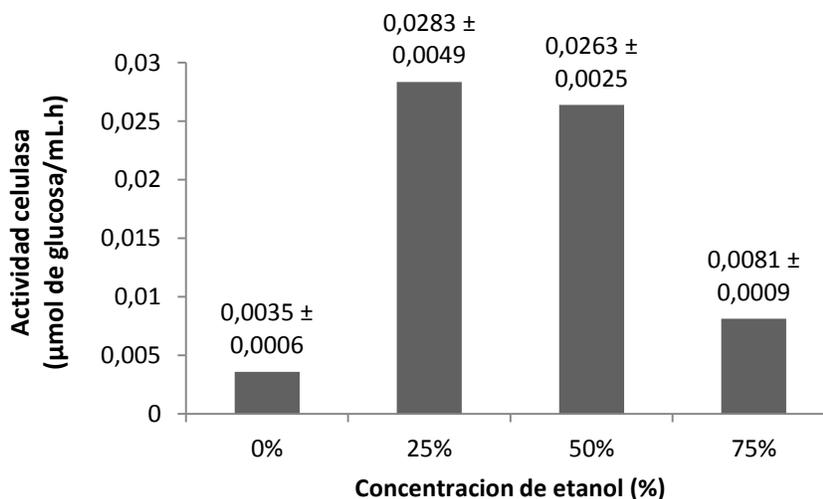
**Figura 12.** Determinación de actividad celulasa (µmoles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papelerero disgregado a diferentes tiempo de incubación en agitación: 48, 96, 168, 216 y 264 horas.

Los resultados concuerdan con los encontrados en los trabajos de Ramos & Gutiérrez (1999) donde las enzimas celulasas producidas por *Trichoderma reesei* LM-UC4 se colocaron en fermentación sumergida realizada en erlenmeyers sobre un medio con bagacillo como fuente carbonada y torta de soya como fuente nitrogenada, teniendo como resultado que la actividad enzimática fue incrementándose a medida que transcurre el tiempo, obteniéndose la máxima actividad entre las 120 y 144 horas de fermentación.

Con este ensayo final del tiempo de fermentación, se podría decir que las condiciones óptimas alcanzadas en este estudio son: lodo disgregado al 3%, sales minerales al 3%, pH 3, tiempo de incubación postfermentativa entre las (96 y 120h), temperatura de incubación postfermentativa 40°C y tiempo de fermentación de 264 h; obteniendo un rendimiento de actividad celulasa de 0,1355±0,0027 µmoles de glucosa/mL.h (Figura 12), la cual tuvo un aumento de 90% de la actividad, en comparación con la actividad celulasa, al inicio del estudio, sin condiciones óptimas(0,0148±0,0114). Además en este cultivo se obtuvo 3,9 grados briz.

## 6.10. Precipitación de enzimas celulasas.

Para la obtención de un producto semicomercial, es necesario concentrar el pool enzimático obtenido en las fermentaciones, con la finalidad de disminuir el volumen requerido para su uso y facilitar su transporte y almacenamiento. Para obtener el precipitado de enzimas se utilizó etanol a diferentes concentraciones. En la Figura 13, se muestra la actividad para el grupo control (sin precipitar) y los tres tratamientos (25, 50 y 75 % de etanol). Se puede observar que el grupo control tuvo menor actividad que los otros tratamientos ( $0,0035 \pm 0,0006$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ ). Por otro lado, la actividad del tratamiento de 25% y 50% son las mayores obtenidas y similares entre sí ( $0,028 \pm 0,0049$  y  $0,026 \pm 0,0025$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ , respectivamente) (Apéndice Tabla IX). Finalmente, en el tratamiento con 75% de etanol la actividad disminuyó con respecto a los demás tratamientos. En los tratamientos de 25 y 50 % de etanol, se logra incrementar la actividad celulasa siete veces.



**Figura 13.** Determinación de actividad celulasa en medios con lodo papелero disgregado, precipitados con diferentes concentraciones de etanol.

Según Mariño *et al.*, (2015) se obtuvo un incremento de precipitado de proteína obtenidas de *Trichoderma harzianum*, a concentraciones de etanol entre 50% y 66% (v/v) a 5°C a un pH de 5. En ese estudio se obtuvo mayor actividad celulasa de *Trichoderma harzianum* con concentraciones de etanol a un 90%, evaluando tanto la concentración del agente como la temperatura y el tiempo de precipitación.

Además, la adición de etanol posee una ventaja en comparación con otras sustancias comúnmente usada con este propósito como el sulfato de amonio, y es su bajo costo y capacidad de ser reciclado por destilación simple después de la separación de líquido, reduciendo así el impacto medioambiental del efluente (Farinas *et al.*, 2011).

## 7.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se lograron obtener 6 aislados fúngicos con capacidad celulolítica, de los cuales, el aislado 1 fue capaz de degradar la celulosa del lodo papelerero en mayor medida.

Las mejores condiciones para la obtención de las mayores actividades celulasas son: sustrato disgregado; concentración de lodo papelerero al 3% p/v; sales minerales Nutrisol P<sup>®</sup> y Nutrisol K<sup>®</sup> al 3 % p/v de cada una; medio sin modificación de pH (pH 3); tiempo óptimo de incubación fermentativa en agitación entre 168 y 264 horas; incubación postfermentativa (40°C, sin agitación) entre 96 y 120 h; temperatura de incubación postfermentativa (sin agitación) a 40°C. Obteniendo un rendimiento de actividad celulasas de  $0,1355 \pm 0,0027$   $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$

La precipitación de las enzimas obtenidas de las fermentaciones sumergidas con etanol, fue más eficiente en los tratamientos con 25% y 50% de etanol.

Es necesario realizar la identificación a nivel de especie de la cepa estudiada (aislado 1) con la finalidad de reportar esta información y comparar los resultados con actividades enzimáticas de la misma especie.

El escalamiento del proceso a niveles semiindustriales es un paso necesario, con la finalidad de ensayar todas las variables en un volumen de trabajo mayor, optimizando las mismas bajo esas condiciones.

Es posible concentrar y esterilizar la glucosa obtenida en el proceso con las variables óptimas, e inocularla con levaduras para la realización de una fermentación alcohólica, estudiando así la posibilidad de obtener etanol a partir de lodo papelerero.

## 8.-BIBLIOGRAFÍA

1. Ali S., A. Sayed, R. Sarker & R. Alam. 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. World J. Microbiol. Biotechnol.7(1):62-66
2. Alvarez, P.E., Z. Corzi, G. Yañez & Y.Pérez. 2014. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pretratamiento de Residuos Lignocelulósicos. Biotecnología.18 (3)11-29
3. Aro, N., T. Pakula, M. Pentilla. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews 29:719-739
4. Ascuasiati, A. 2012. Plagas domésticas. Editorial Publicaciones Agrícola de oasis colonial.España.
5. Baldini,A& L. Pancel. 2002. Agentes de daño en el bosque nativo. Editorial universitaria. Santiago deChile
6. Baldrian, P & V. Valásková. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol Rev.32(3):501-21
7. Bochini, D., H. Alves, R. Riveiro, Ferreira, H, Ferreira, M. Moretti, R. Da silva & E. Gomes. (2011) Agroindustrial Wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. IWM. 2: 319-361.
8. Campbell, N & J. Reece (2007) Biología. Editorial Médica panamericana. MadridEspaña.
9. Chaparro,D& D. Rosas. (2006). Aislamiento y Evaluación De La Actividad Enzimática De Hongos Descomponedores De Madera En La Reserva Natural La Montaña Del Ocaso, Quimbaya - Quindío [PDF]. Trabajo Titulación Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Carrera De MicrobiologíaIndustrial.

10. Chen, H. Han, Q. Daniel, K. Venditti, R. Jameel, H. 2014. Conversion of Industrial Paper Sludge to Ethanol: Fractionation of Sludge and Its Impact. Department of Forest Biomaterials, North Carolina State University, 1204 Biltmore Hall, Campus Box 8005, Raleigh, NC, 27695-8005, USA.
11. Cullen, D & P.J. Kersten 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation en Brambl R & Marzlut. The Mycota III. Biochemistry and molecular biology. 2da edicion. Springer- Verlag. Berlin,Germany.
12. Das K, Solehah A, Balaumani VT, Amiza MA (1994) Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. Journal of Food Science and Technology 31:508-510.
13. Dashtban M., H. Schraft & W. Qin (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. Int J Biol Sci. 5(6): 578- 595.
14. Diorio,L., F. Forchiassin, V. Papinutti & D. Sueldo. 2003. Actividad enzimática y degradación en diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Rev Iberoam Micol.20:11-15
15. Encinas, O., S. Mohali, N. Mora & N. Villarreal. 2002. Microorganismos frecuentemente hallados en la madera de Pino Caribe bajo riesgo de aspersión en patio de rolas. Rev. Forest Vzlna. 46(1)9-14.
16. Farinas, C. Scarpelini, L. Miranda, E. Bertucci, V. 2011. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol. 28, 1: 17 – 26.
17. Ferrer, M., M. León & A. Michelena. 2011. Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar.

45(1):3-12

18. Freitas SP, Lago RCA, Jablonka FH, Hartman L (1993) Extraction aqueuse enzymatique de l'huile d'avocat a partir de la pulpe fraiche. *Revue Francaise des Corps Gras* 2:365-371.
19. Gáfaró, J. 1995. *Acabados para la madera*. Centro Editorial Javeriana. Santa Fé de Bogotá
20. Gaitan, D & L. Perez. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de Grado título Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Carrera De Microbiología Industrial.
21. García, M. R. Quintero & A. Lopez. 2004. *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa. México.
22. Gautam, S. Bundela, P. Pandey, A. Jamaluddin, K. Awasthi, M. Sarsaiya, S. 2011. Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*. p2-8.
23. Godio, R. P., O.A. Mercuri & F. Forchiassin .2000. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad ligninolítica de *Stereum hirsutum*. *Revista Argentina de Microbiología* 32(1):7-14
24. González, Y., J. Meza, O. Reynoso & J. Córdova. 2013. Synthesis and biodegradation of polyhydroxialkanoates: Bacterially produced plastics. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 29(1)77-115
25. Gonzales, G. 2012. *Patologías Bióticas de la madera*. Universidad del Bio Bio- Concepción. Chile
26. Ghose, V. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* Vol. 59: 257-268.

27. Ikram-ul-Haq, Mohsin Javed, M. Saleem Kha, T. 2006. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology* 8:609-614.
28. Kang, S., Y. Park, J. Lee, S. Hong & S. Kim. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 91(2):153-156.
29. Karegoudar, T. B., T. Krishnan, R. Levin & A. Netrusov. 2013. Screening of Fungi Isolated from Environmental Samples for Xylanase and Cellulase Production. *ISRN Microbiology*.
30. Kucharzyk, K. H., G. Janusz, I. Karczmarczyk, & J. Rogalski. 2012. Chemical Modifications of Laccase from White-Rot Basidiomycete *Cerrena unicolor*. *Appl Biochem Biotechnol.* 168(7):1989–2003.
31. Lincoln, T & E. Zeiger. 2006. *Fisiología Vegetal*. Editorial Sinauer Associates. España
32. Mariño, M. Freitas, S. Miranda, E. 2015. Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* p49p11 *Brazilian Journal of Chemical Engineering* Vol. 32, 02: 325 –333.
33. Marmolejo, J & H. Méndez. 2007. Diversidad de hongos causantes de pudrición de la madera en cinco especies de pinos en Nuevo León, México. *Revista mexicana de micología.* (25)51-57
34. Markham, P & M. Bazin. 1991. *Handbook of applied mycology. Soil and plants.* Vol 1. Chapter 15: Decomposition of cellulose by fungi. Banaras. Hindu University. Vanarasi, India. 697p
35. Martínez, C., E. Balcázar. E, Dantán. J, Folch . 2008. *Celulasas fúngicas:*

Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Rev Latinoam Microbiol. 50 (3-4):119-131

36. Milala, M., A. Shugaba, A. Gidado, A. Ene & J. Wafar. 2005. Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspegillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(4):325-328
37. Mohammed, I & Fagade. O. 2010. Optimization studies on cellulase enzyme production by an isolated strain of *Aspergillus niger* YL128. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(24):2635-2639
38. Martínez, A., M. Speranza, F. Ruiz-Dueñas, Ferreira, P. Ferreira, Camarero, S. Camarero, F. Guillén, M. Martínez, A. Gutiérrez & J. del Río. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8:195-204.
39. Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalisyc Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31:426-428
40. Moore-Lackender, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey, USA. 574p.
41. Moreno, R., R. Valenzuela, R. Marmolejo, J. Guadalupe & E. Aguirre (2009) Hongos degradadores de la madera en el estado de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80(1) :13-22
42. Nochure SV, Roberts MF, Demain AI (1993). True cellulase production by *Clostridium thermocellum* grown on different carbon sources. *Biotech. Lett.* 15: 641-646.
43. Nogués, F. 2010. *Energía de la biomasa*. Prensas Universitarias de Zaragoza. (1):557p
44. Ojumu, T., B. Solomon, E. Betiku, S. Layokun & B. Amigun. (2003). Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *Afr. J Biotechnol.* 2(6):150-152.

45. Ovando-Chacón, S. & Waliszewski, K. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*, 21 (42):113-122.
46. Peraza, F. & I. Bobadilla. 2001. Protección preventiva de la madera. Editorial Asociación de Investigación y Técnica de las Industrias de la Madera y Corcho. Madrid-España
47. Pereira, J., A. Simões, P. Santos & R. Do Nascimento. 2011. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*. 2011(167248)
48. Pentilla, M., Saloheimo, M. 1999. Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. In: Oliver, R. and Schweizer, M. *Molecular Fungal Biology*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom. 377p
49. Ponce, T. 2002. Celulasa y xilanasa en la industria. Avance y perspectiva. 21:273–277
50. Roldan, A., V. Palacios, X. Peñate, T. Benitez y L. Perez. 2006. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino grapes in the Sherry Region. *J. Food Eng.* 75:375–382
51. Ramos, R & Gutiérrez, M. 1999. Determinación de patrones electroforéticos de celulasas producidas en fermentación sumergida por *Trichoderma reesei* LM-UC4. *Biota*. 99(18).
52. Rayner, ADM & L. Boddy. 1998. Fungal Decomposition of Wood Its Biology and Ecology. Jnh Wiley and Sons Ltd. Inglaterra. 587p.
53. Rytioja, J., K. Hildén, J. Yuzon, A. Hatakka, R. De Vries. & M. Mäkela. 2014. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 78(4):614-49
54. Sridevil, A., S. Radha & Narasimha, G. 2011. Pretreatment of rice bran for effective production of cellulase by *Aspergillus niger*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(4):536-543

55. Saccarello, M. 2010. La madera: de su conocimiento a su conservación. Editorial Gente Común. Bolivia
56. Saldarriaga, Y. 2001. Manual de micología Aplicada. Universidad de Antioquia. Medellin, Colombia. 97p
57. Sohail, M., R. Siddiqi, A. Ahmad & S. Khan. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *N Biotechnol.* 25 (6): 437–441
58. Suesca, A. 2012. Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp, con biomasa lignocelulósica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá Colombia
59. Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an an alternative oxygen acceptor. *Annual Review of Biochemistry*, 6:24-30.
60. Valášková, V & B. Petr. 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology*. 152:3613-3622
61. Vasquez, A. 2013. Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Universidad Iberoamericana. México
62. Větrovský, T., B. Petr & G. Jiří. 2013. Extracellular Enzymes of the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* and Purification of 1,4- $\beta$ -Glucosidase. *Appl Biochem Biotechnol.* 169(1):100-9.
63. Zanni, E. 2008. Patología de la madera. Editorial Brujas. Argentina
64. Zhang, Y., M. Himmel & J. Mielenz. 2006. Outlook for cellulose improvement; Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances.* 24:452-48

## 9.-APÉNDICE

### Análisis estadístico de los datos.

Tabla I. Evaluación preliminar de la actividad celulasa

Kruskal-Wallis test

H: 33,47  
Hc: 33,49  
p(same): 3,037E-06

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|   | 1       | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 |         | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 |
| 2 | 0,07612 |          | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 |
| 3 | 0,07612 | 0,07612  |          | 0,005075 | 0,005075 | 0,005075 |
| 4 | 0,07612 | 0,07612  | 0,07612  |          | 0,04533  | 0,005075 |
| 5 | 0,07612 | 0,07612  | 0,07612  | 0,6799   |          | 0,008239 |
| 6 | 0,07612 | 0,07612  | 0,07612  | 0,07612  | 0,1236   |          |

Tabla II. Efecto de la disgregación de la fuente de carbono

Mann-Whitney

|                   |         |                       |         |
|-------------------|---------|-----------------------|---------|
| <i>N.L</i>        |         | <i>L</i>              |         |
| <b>N:</b>         | 5       | <b>N:</b>             | 5       |
| <b>Mean rank:</b> | 1,7     | <b>Mean rank:</b>     | 3,8     |
| <b>U:</b>         | 2       | <b>Monte Carlo p:</b> | 0,0305  |
| <b>z:</b>         | -2,089  | <b>Exact p:</b>       | 0,03175 |
| <b>p(same):</b>   | 0,03671 |                       |         |

Tabla III .Efecto de la fuente de carbono

Kruskal-Wallis test

H: 17,86  
Hc: 17,86  
p(same): 0,0004707

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|       | 0,50%   | 1%      | 2%      | 3%      |
|-------|---------|---------|---------|---------|
| 0,50% |         | 0,01219 | 0,01219 | 0,01219 |
| 1%    | 0,07311 |         | 0,01219 | 0,01219 |
| 2%    | 0,07311 | 0,07311 |         | 0,01219 |
| 3%    | 0,07311 | 0,07311 | 0,07311 |         |

Tabla IV. Efecto de las sales minerales

Kruskal-Wallis test

H: 16,14  
Hc: 16,16  
p(same): 0,00106

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|     | 0,5     | 1       | 2       | 3       |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 0,5 |         | 0,01219 | 0,6761  | 0,01219 |
| 1   | 0,07311 |         | 0,01219 | 0,01219 |
| 2   | 1       | 0,07311 |         | 0,01219 |
| 3   | 0,07311 | 0,07311 | 0,07311 |         |

Tabla V. Efecto del pH

| Kruskal-Wallis test  |         |         |         |         |
|--|---------|---------|---------|---------|
| <p>H: 10,83<br/> Hc: 10,91<br/> p(same): 0,01267</p> <p><b>Mann-Whitney pairwise comparisons,<br/> Bonferroni corrected \ uncorrected:</b></p> |         |         |         |         |
|  | pH_4    | pH_5    | pH_6    | control |
| pH_4   |         | 0,9168  | 0,6015  | 0,01219 |
| pH_5   | 1       |         | 0,4647  | 0,01629 |
| pH_6   | 1       | 1       |         | 0,01219 |
| control  | 0,07311 | 0,09776 | 0,07311 |         |

Tabla VI. Efecto del tiempo de incubación

Kruskal-Wallis test

H: 34,65  
Hc: 34,65  
p(same): 5,485E-07

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|     | 24       | 48        | 72       | 96        | 120       |
|-----|----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| 24  |          | 0,0001827 | 0,001315 | 0,0001827 | 0,0001827 |
| 48  | 0,001827 |           | 0,9698   | 0,002202  | 0,002202  |
| 72  | 0,01315  | 1         |          | 0,002202  | 0,004586  |
| 96  | 0,001827 | 0,02202   | 0,02202  |           | 0,9698    |
| 120 | 0,001827 | 0,02202   | 0,04586  | 1         |           |

Tabla VII. Efecto de la temperatura de incubación

Kruskal-Wallis test

H: 13,78  
Hc: 13,79  
p(same): 0,003222

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|    | 25     | 40      | 50      | 60      |
|----|--------|---------|---------|---------|
| 25 |        | 0,01996 | 0,03038 | 0,06619 |
| 40 | 0,1198 |         | 0,1779  | 0,02157 |
| 50 | 0,1823 | 1       |         | 0,01996 |
| 60 | 0,3972 | 0,1294  | 0,1198  |         |

Tabla VIII. Efecto del tiempo de agitación

Kruskal-Wallis test

H: 24,3  
Hc: 24,33  
p(same): 0,0001903

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|     | 0      | 48     | 96      | 168     | 216     | 264     |
|-----|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| 0   |        | 0,3913 | 0,01996 | 0,01996 | 0,01996 | 0,01996 |
| 48  | 1      |        | 0,1437  | 0,01219 | 0,01219 | 0,01219 |
| 96  | 0,2995 | 1      |         | 0,01219 | 0,01219 | 0,01219 |
| 168 | 0,2995 | 0,1828 | 0,1828  |         | 0,8345  | 0,01219 |
| 216 | 0,2995 | 0,1828 | 0,1828  | 1       |         | 0,1437  |
| 264 | 0,2995 | 0,1828 | 0,1828  | 0,1828  | 1       |         |

Tabla IX. Precipitación de enzima

Kruskal-Wallis test

H: 15,55  
Hc: 15,56  
p(same): 0,001403

Mann-Whitney pairwise comparisons,  
Bonferroni corrected \ uncorrected:

|     | 0%      | 25%     | 50%     | 75%     |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 0%  |         | 0,01219 | 0,01219 | 0,03671 |
| 25% | 0,07311 |         | 1       | 0,01219 |
| 50% | 0,07311 | 1       |         | 0,01219 |
| 75% | 0,2203  | 0,07311 | 0,07311 |         |